

# ROYAUME DE BELGIQUE

MINISTRE DES AFFAIRES ECONOMIQUES  
ADMINISTRATION DE LA POLITIQUE COMMERCIALE

F3U



**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

Il est certifié que les annexes à la présente sont la copie fidèle de documents accompagnant une demande de brevet d'invention tels que déposée en Belgique suivant les mentions figurant au procès-verbal de dépôt ci-joint.

Bruxelles, le 26 - 8 - 1998

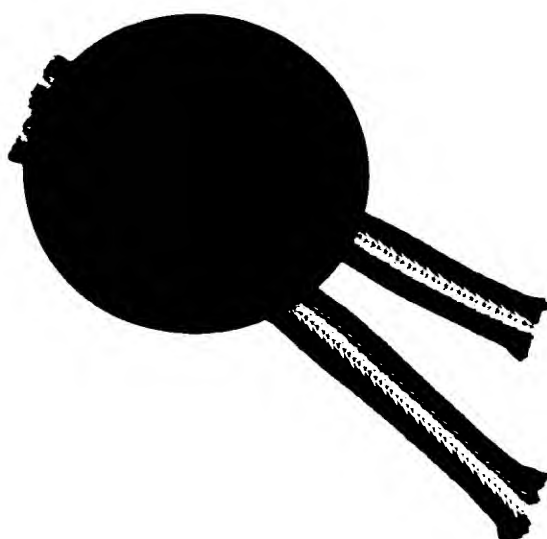
Pour le Conseiller de l'Office  
de la Propriété industrielle

Le fonctionnaire délégué,

PETIT M.  
Conseiller adjoint



E3-0001





OFFICE DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PROCES-VERBAL DE DÉPÔT  
D'UNE DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

098000609

N° :

Aujourd'hui, le 17 - 8 - 1986 en dehors des heures d'ouverture du bureau de dépôt, l'OFFICE DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE a reçu un envoi postal contenant une demande en vue d'obtenir un brevet d'invention relatif à : COMPOSITION PHARMACEUTIQUE DESTINÉE AU TRAITEMENT OU À LA PRÉVENTION DU DIABÈTE OU DU CANCER.

introduite par : VAN MALDEREN ERIC

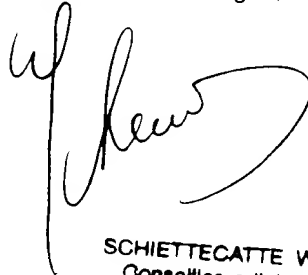
agissant pour : UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN  
Halles Universitaires  
Place de l'Université 1,  
B-1348 LOUVAIN-LA-NEUVE BELGIQUE

en tant que mandataire agréé par l'établissement officiel du demandeur.

La réception de la demande de brevet susmentionnée a été actée ce jour, à 1400 heures.

La demande, telle que déposée, contient les documents nécessaires pour obtenir une date de dépôt conformément à l'article 16, paragraphe 1er de la loi du 28 mars 1984.

Le fonctionnaire délégué,

  
SCHIETTECATTE W.  
Conseiller adjoint

Bruxelles, le 17 - 8 - 1986

5

COMPOSITION PHARMACEUTIQUE DESTINEE AU TRAITEMENT OU A LA  
PREVENTION DU DIABETE OU DU CANCER

10

Objet de l'invention

La présente invention est relative à une nouvelle composition pharmaceutique destinée au traitement ou à la prévention du diabète ou du cancer, en particulier  
15 une thérapie cellulaire du diabète par la création d'un pancréas artificiel.

Arrière-plan technologique à la base de l'invention

Le diabète est un terme générique sous lequel  
20 on désigne des affections caractérisées par l'association d'une polyurie et d'une polydipsie. Le diabetes mellitus, dénommé également ci-après diabète sucré, qui peut être de type 1 ou de type 2, est dû à un mauvais fonctionnement des cellules bêta du pancréas endocrinien (îlots de Langerhans)  
25 qui synthétise et secrète l'insuline (Gerich & Haeften, COED 5, pp. 144-148 (1998)). Il s'accompagne souvent (diabète de type 2) d'une résistance des tissus cibles à l'action de l'insuline.

Le diabète sucré est l'une des maladies  
30 métaboliques les plus fréquentes, en particulier dans le monde industrialisé (Leahy, COED 5, pp. 73-74 (1998)). Il est caractérisé par une déficience de l'utilisation du glucose et peut avoir des conséquences pathologiques graves et parfois mortelles, telles que des troubles métaboliques,

des problèmes cardiovasculaires et neurologiques, des lésions rétiniennes ou rénales. Le traitement par insuline exige une ou plusieurs injections quotidiennes à vie.

Par conséquent, il existe un besoin certain  
5 de remplacer ces injections par des systèmes transplantables (Gage et al., Nature 392, Supplément 3 (1998)).

### Etat de la technique

10 Le document Lemaigre et al. (1996) décrit un cDNA codant le facteur nucléaire hépatocytaire 6, dénommé ci-après HNF-6. Cette protéine contrôle la transcription de certains gènes dans un petit nombre de tissus où elle est exprimée (Samadani & Costa (1996)). L'expression de cette  
15 molécule a été notamment identifiée dans le pancréas de souris (Landry et al. (1997) et Rausa et al. (1997)).

La protéine HNF-6 contient deux domaines de liaison à l'ADN, un domaine appelé cut et un domaine appelé homéo, caractéristique de HNF-6 par la présence d'une  
20 phénylalanine en position 48 et d'une méthionine en position 50 (dénommé ci-après dyade F48M50).

La demande de brevet français FR-2,696,755 décrit une capsule implantable comprenant une enveloppe  
externe constituée par un hydrogel d'acrylonitrile et de  
25 méthallylsulfonate de sodium, un noyau interne comprenant une substance encapsulée pouvant être constituée d'îlots de Langerhans, de cellules bêta pancréatiques ou d'hépatocytes. L'enveloppe est une membrane biocompatible sélectivement perméable à l'insuline ou aux nutriments  
30 nécessaires à la substance à encapsuler. Ce produit peut être utilisé dans la transplantation de cellules ou de groupes de cellules tels que des îlots de Langerhans pour pallier l'insuffisance de production d'insuline chez les malades diabétiques.

La demande internationale de brevet WO95/09231 décrit des nouvelles lignées cellulaires bêta-insulino-sécrétrices pouvant se présenter sous forme de "pseudo-îlots" pouvant être encapsulés dans un hydrogel biocompatible; éventuellement incorporé dans des fibres transplantables destinées à être introduites chez le patient par une voie sous-cutanée ou intrapéritonéale de manière à traiter des malades insulino-dépendants.

La demande internationale de brevet WO95/29988 décrit un procédé de culture de lignées cellulaires, en particulier de cellules pancréatiques, susceptibles de créer des îlots cellulaires réimplantables in vivo chez un mammifère de manière à traiter des maladies pancréatiques chez l'homme ou l'animal.

15

#### Buts de l'invention

La présente invention vise à fournir une nouvelle composition pharmaceutique susceptible d'être utilisée dans la prévention ou le traitement du diabète ou du cancer et pouvant être utilisée soit dans le domaine de la thérapie génétique, soit dans le domaine de la thérapie cellulaire sous la présentation d'amas cellulaires ou la formation d'un tissu ou d'un organe pancréatique artificiel.

25

#### Éléments caractéristiques de l'invention

Les Inventeurs ont découvert de manière inattendue que l'invalidation du gène HNF-6 chez la souris montre que ce gène est essentiel pour le fonctionnement des îlots de Langerhans et pour la réponse de l'organisme à l'insuline. De plus, les Inventeurs ont montré que d'autres protéines semblables à HNF-6, qui partagent avec HNF-6 deux particularités, d'une part la présence d'un seul domaine cut et d'autre part la présence de la dyade F48M50 dans le

domaine homéo (Lannoy et al. (1998)) appartenant à une même famille dénommée ONECUT (en abrégé OC) (Lannoy et al. (1998)), étaient également impliquées dans certains mécanismes métaboliques essentiels. Parmi la famille des protéines ainsi définies, qui comprend notamment la protéine HNF-6 et la protéine OC-2, certaines protéines ont des fonctions essentielles chez l'animal, en particulier chez l'homme, en particulier dans le métabolisme du glucose. En outre, de telles molécules pourraient être utilisées pour traiter un certain nombre d'affections et de maladies, en particulier le diabète ou le cancer, de préférence le mélanome.

La présente invention est donc relative à une composition pharmaceutique comprenant un véhicule pharmaceutique adéquat et un élément choisi parmi le groupe constitué par une séquence nucléotidique codant une protéine membre de la famille ONECUT, en particulier le HNF-6 ou le facteur OC-2 dont la séquence nucléotidique et peptidique est décrite ci-après (figures 1a et 1b), un vecteur comprenant ladite séquence nucléotidique, la séquence polypeptidique encodée et/ou une lignée cellulaire transformée par ledit vecteur et exprimant ces dites séquences nucléotidiques, en particulier susceptibles de synthétiser le HNF-6 ou un autre membre de la famille ONECUT tel que le facteur OC-2.

On entend par "séquence nucléotidique codant le HNF-6", la séquence codante correspondant à la séquence du cDNA HNF-6 telle que déjà décrite, en particulier par Lemaigre et al. (1996), et des séquences équivalentes, humaines ou animales, susceptibles de s'hybrider avec ce cDNA. Cette hybridation s'effectue de préférence dans des conditions stringentes de manière à identifier les différentes séquences génomiques codant une séquence d'acides aminés identique ou similaire à celle de HNF-6 ou

OC-2. En particulier, d'autres séquences spécifiques d'autres mammifères ayant la même fonction, mais différentes en particulier par la redondance du code génétique. Des conditions d'hybridation standard sont de

5 préférence les suivantes : hybridation à 40 °C dans 50% de formamide, 5x SSC 20 mM sodium phosphate, pH 6.8, lavage dans 0.2x SSC à 50 °C. Des modifications de ces conditions peuvent être proposées par l'homme de l'art en fonction de la longueur et du contenu en nucléotides GC dans la

10 séquence à hybrider. D'autres conditions d'hybridation sont notamment celles décrites par Sambrook et al., §§ 9.47-9.51 in *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989).

15 Selon l'invention, le gène codant le HNF-6 utilisé concerne des séquences génomiques codant les deux isoformes alpha et bêta de HNF-6 telles que décrites par Lannoy et al. (1998).

La composition pharmaceutique de l'invention

20 peut être utilisée pour obtenir une thérapie génétique et/ou cellulaire d'un patient susceptible de développer un diabète ou souffrant d'un diabète, ou susceptible de développer un cancer ou souffrant d'un cancer, en particulier d'un mélanome. Dans le domaine de la thérapie

25 génétique, la séquence nucléotidique de l'invention peut être administrée au patient ou à des lignées cellulaires du patient par un traitement ex vivo de manière nue par des procédés bien connus de l'homme de l'art ou par l'intermédiaire d'un vecteur, de préférence choisi parmi le

30 groupe constitué par les plasmides, les virus, les phagemides, les vésicules lipidiques telles que les lipides cationiques, les liposomes ou un mélange d'entre eux. Le vecteur incorporera tous les éléments nécessaires pour

obtenir l'expression de la séquence nucléotidique selon l'invention chez le patient, de préférence dans les lignées cellulaires spécifiques à traiter, telles que les cellules pancréatiques impliquées dans la synthèse de l'insuline, les cellules hépatiques impliquées dans la réponse à l'insuline ou des cellules de l'épiderme ou du derme susceptibles de développer un mélanome.

La composition pharmaceutique de l'Inventeur peut être également utilisée en thérapie cellulaire par injection directe des cellules par un procédé in vivo ou ex vivo ou par la formation d'un agrégat cellulaire artificiel tel que décrit dans les demandes de brevet FR-2,696,755, WO95/09231 et WO95/29988. Il est possible d'obtenir la prolifération des cellules transformées par la séquence nucléotidique de l'invention ou le vecteur de l'invention par des procédés bien connus de l'homme de l'art, en particulier ceux décrits dans les demandes de brevet WO97/49728 et WO95/29988.

Le véhicule pharmaceutique selon l'invention varie selon le mode d'administration choisi (intraveineuse, intramusculaire, orale, etc.) et est un excipient bien connu de l'homme de l'art, présenté sous forme de ~~tablettes, de pilules, de capsules, de solutions, de~~ sirops, etc. Ce composant comprend éventuellement des adjuvants (en particulier une hormone de croissance) bien connus de l'homme de l'art de manière à induire des effets synergiques ou supprimer certaines réactions immunitaires ou cellulaires spécifiques ou de manière à réduire certains effets secondaires ou toxiques non désirés du principe actif ou du véhicule de l'invention.

Le pourcentage de produit actif (séquence nucléotidique, séquence d'acides aminés ou fragments de celles-ci, vecteur, lignée cellulaire, etc.) dans la composition pharmaceutique peut varier selon de très larges

gammes, uniquement limitées par la fréquence d'administration, la tolérance et le niveau d'acceptation de la composition selon l'invention par le patient.

La présente invention concerne également  
5 l'utilisation de la composition pharmaceutique de l'invention pour la préparation d'un médicament destiné au traitement et/ou à la prévention du diabète de type 1 ou de type 2, des affections liées au diabète, en particulier des affections liées au mauvais fonctionnement des cellules  
10 bêta du pancréas endocrinien qui synthétise et sécrète l'insuline, et/ou pour le traitement du cancer, en particulier du mélanome.

Un dernier aspect de la présente invention concerne le procédé de traitement d'un patient, en  
15 particulier d'un patient susceptible de développer un diabète, souffrant d'un diabète ou susceptible de développer un cancer ou souffrant d'un cancer, en particulier un mélanome, par lequel on administre audit patient la composition pharmaceutique de l'invention par un  
20 procédé de traitement in vivo ou ex vivo.

---

REFERENCES

- Kahn, B.B., Type 2 Diabetes : when insulin secretion fails to compensate for insulin resistance. *Cell* 92, pp. 593-596 (1998)
- 5 Landry, C. et al., HNF-6 is expressed in endoderm derivatives and nervous system of the mouse embryo and participates to the cross-regulatory network of liver-enriched transcription factors. *Dev. Biol.* 192, pp. 247-257
- 10 (1997)
- Lannoy, V.J. et al., Isoforms of hepatocyte nuclear factor-6 differ in DNA-binding properties, contain a bifunctional homeodomain and define the new ONECUT class of homeodomain
- 15 proteins. *J. Biol. Chem.* 273, pp. 13552-13562 (1998)
- Lemaigre, F.P. et al., Hepatocyte nuclear factor-6, a transcription factor that contains a novel type of homeodomain and a single cut domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- 20 USA. 93, pp. 9460-9464 (1996)
- Rausa, F. et al., The cut-homeodomain transcriptional activator ~~HNF-6~~ is coexpressed with its target gene ~~HNF-3b~~
- ~~in the developing murine liver and pancreas. *Develop. Biol.*~~
- 25 192, pp. 228-246 (1997)
- Samadani, U. & Costa, R.H., The transcriptional activator hepatocyte nuclear factor-6 regulates liver gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 16, pp. 6273-6284 (1996)

REVENDICATIONS

1. Composition pharmaceutique comprenant un véhicule pharmaceutique adéquat et un élément choisi parmi le groupe constitué par une séquence nucléotidique codant un peptide de la famille ONECUT, un vecteur comprenant cette séquence nucléotidique, la séquence polypeptidique codée par cette séquence nucléotidique et/ou une lignée cellulaire transformée par ledit vecteur et exprimant le peptide de la famille ONECUT.
2. Composition pharmaceutique selon la revendication 1, caractérisée en ce que le peptide de la famille est le HNF-6.
3. Composition pharmaceutique selon la revendication 1, caractérisée en ce que le peptide de la famille est le OC-2.
4. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que les séquences nucléotidique et polypeptidique susmentionnées sont des séquences nucléotidique et polypeptidique humaines.
5. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le vecteur est choisi parmi le groupe constitué par les plasmides, les virus, les phagemides, les vésicules lipidiques, en particulier les vésicules cationiques, les liposomes ou un mélange d'entre eux.
6. Utilisation de la composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications précédentes pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement du diabète de type 1 ou de type 2 ou des affections liées au diabète, et à la prévention et/ou au traitement du cancer en particulier du mélanome.

7. Procédé de traitement thérapeutique d'un patient, de préférence d'un patient humain susceptible de développer ou souffrant d'un diabète ou d'un cancer, en particulier d'un mélanome, caractérisé en ce que l'on

5 administre ex vivo la composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 en isolant un fluide corporel ou une ou plusieurs cellules du patient, en traitant lesdites cellules ou les cellules présentes dans ce fluide corporel par le vecteur de l'invention, et en

10 réinjectant audit patient les cellules transformées.

Sequence 0C-2

CCCCCGCCCGCCCGGGCCCTGATGGACTGAATGAAGGCTGCCTACACCGCCTATCGATGCCTCACCAA 69  
AGACCTAGAACGTGCGCCATGAACCCGGAGCTGACAATGGAAGTCTGGGCACTTTGCACGGCGCGCGC 137  
M N P E L T M E S L G T L H G A R 17  
GGCGGCGGCAGTGGCGGGGGCGGCGGCGGGGGCGGCGGGGGCGGCGGCGGGGGCCCGGCCATGAGCAG 207  
G G G S G G G G G G G G G G G G G G P G H E Q 40  
GAGCTGCTGGCCAGCCCCAGCCCCACCACGCGCGCCGCGGCGCGCTGGCTCGCTGCGGGGCCCTCCG 276  
E L L A S P S P H H A R R G P R G S L R G P P 63  
CCGCCTCCAACCGCGCACCAGGAGCTGGGCACGGCGGCAGCGGCGGCAGCGGCGGCGTCCGCGCTCGGCC 345  
P P P T A H Q E L G T A A A A A A S R S A 86  
ATGGTCACCAGCATGGCCTCGATCCTGGACGGCGGCGACTACCGGCCCCGAGCTCTCCATCCCGCTGCAC 414  
M V T S M A S I L D G G D Y R P E L S I P L H 109  
CACGCCATGAGCATGTCCTGCGACTCGTCTCCGCTGGCATGGGCATGAGCAACACCTACACCACGCTG 484  
H A M S M S C D S S P P G M G M S N T Y T T L 132  
ACACCGCTCCAGCCGCTGCCACCCATCTCCACCGTGTCTGACAAGTTCCACCACCCTCACCCGCACCAC 552  
T P L Q P L P P I S T V S D K F H H P H P H H 155  
CATCCGCACCACCACCACCACCACCACCAGCGCCTGTCCGGCAACGTCAGCGGCAGCTTCACCCCTC 621  
H P H H H H H H H H Q R L S G N V S G S F T L 178  
ATGCGCGACGAGCGCGGGCTCCCGGCCATGAACAACCTCTACAGTCCCTACAAGGAGATGCCCCGGCATG 690  
M R D E R G L P A M N N L Y S P Y K E M P G M 201

FIG.1

Sequence OC-2 (SUITE)

AGCCAGAGCCTGTCCCCGCTGGCCGCCACGCCGCTGGGCAACGGGCTAGGCGGCCTCCACAACGCGCAG 759  
S Q S L S P L A A T P L G N G L G G L H N A Q 224

CAGAGTCTGCCCAACTACGGTCCGCCGGGCCACGACAAAATGCTCAGCCCCAACTTCGACGCGCACCAC 828  
Q S L P N Y G P P G H D K M L S P N F D A H H 247

ACTGCCATGCTGACCCGCGGTGAGCAACACCTGTCCCGCGGCCTGGGCACCCACCTGCGGCCATGATG 897  
T A M L T R G E Q H L S, R G L G T P P A A M M 270

TCGCACCTGAACGGCCTGCACCACCCGGGCCACACTCAGTCTCAGGGCCGGTGCTGGCACCCAGTCGC 966  
S H L N G L H H P G H T Q S H G P V L A P S R 293

GAGCGGCCACCCTCGTCCTCATCGGGCTCGCAGGTGGCCACGTGGGGCCAGCTGGAAGAAATCAACACC 1035  
E R P P S S S S G S Q V A T S G Q L E E I N T 316

AAAGAGGTGGCCAGCGCATCACAGCGGAGCTGAAGCGCTACAGTATCCCCCAGGCGATCTTTGCGCAG 1104  
K E V A Q R I T A E L K R Y S I P Q A I F A Q 339

AGGGTGCTGTGCCGGTCTCAGGGGACTCTCTCCGACCTGCTCCGGAATCCAAAACCGTGGAGTAAACTC 1173  
R V L C R S Q G T L S D L L R N P K P W S K L 362

AAATCTGGCAGGGAGACCTTCCGCGAGGATGTGGAAGTGGCTTCAGGAGCCCCGAGTTCCAGCGCATGTCC 1242  
K S G R E T F R R M W K W L Q E P E F Q R M S 385

GCCTTACGCCTGGCAGCGTGCAAACGCAAAGAGCAAGAACCAAACAAAGACAGGAACAATTCCCAGAAG 1311  
A L R L A A C K R K E Q E P N K D R N N S Q K 408

AAGTCCCGCCTGGTGTTCCTGACCTCCAACGCCGAACACTCTTCGCCATCTTCAAGGAGAACAAACGC 1380  
K S R L V F T D L Q R R T L F A I F K E N K R 431

CCGTCAAAGGAGATGCAGATCACCATTTCCAGCAGCTGGGCCTGGAGCTCACAACCGTCAGCAACTTC 1449  
P S K E M Q I T I S Q Q L G L E L T T V S N F 454

TTCATGAACGCCCCGGCGCCGAGCCTGGAGAAGTGGCAAGACGATCTGAGCACAGGGGGCTCCTCGTCC 1518  
F M N A R R R S L E K W Q D D L S T G G S S S 477

ACCTCCAGCACGTGTACCAAAGCATGATGGAAGGACTCTCACTTGGGCACAAGTCACCTCCAAATGAGG 1587  
T S S T C T K A

FIG.1b

ABREGECOMPOSITION PHARMACEUTIQUE DESTINEE AU TRAITEMENT OU A LA  
PREVENTION DU DIABETE OU DU CANCER.

5

La présente invention concerne une composition pharmaceutique comprenant un véhicule pharmaceutique adéquat et un élément choisi parmi le groupe constitué par une séquence nucléotidique codant un peptide de la famille ONECUT, un vecteur comprenant cette séquence nucléotidique, la séquence polypeptidique codée par cette séquence nucléotidique et/ou une lignée cellulaire transformée par ledit vecteur et exprimant le peptide de la famille ONECUT.

15

